

دانشگاه علوم پزشکی قزوین



دانشکده پیراپزشکی
پایان نامه کارشناسی ارشد
گروه بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

بررسی اثرات اسید چرب امگا-۳ و امگا-۶ بر بیان ژن های WIF-1 و WT1 در سل لاین
AGS سرطان معده

نگارنده : فتانه عابدی

استاد راهنما: دکتر نعمت الله غیبی

استاد مشاور: دکتر مهدی سهمانی - دکتر سحر مقبلی نژاد

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

فهرست اختصارات :

AA: arachidonic acid
ACE: angiotensin-converting enzyme
Ang-II: angiotensin 2
AR: Artrite rheumatoid
ALA: α -Linolenic acid (W3)
AGS: atypical glandular cells
APC: Adenomatous polyposis coli
AP-1: Activator protein 1
B-catenin: Beta catenin
BSA: bovine serum albumin
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
C-myc: Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CaMK 2: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II
CRP: C-reactive protein
COX: Cyclooxygenase
cDNA : complementary DNA
CRP: C-reactive protein
DMSO: dimethyl sulphoide
DHA: docosahexaenoic acid
DKK: Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor
Dsh: Dishevelled
DGLA: dihomogamma linolenic acid
EGFR: Epidermal growth factor receptor
E. coli: Escherichia coli
EFAs: essential fatty acids
EPA: eicosapentaenoic acid
ERK: extracellular-signal-regulated kinase
Fz: Frizzled proteins
FBS: Fatal Bovine Serum
FAP: familial adenomatous polyposis
FGFR: fibroblast growth factor receptor

GLA: gamma linolenic acid
 LA: linoleic acid
 LT: leukotriene
 LX: lipoxin
 LPL: lipoprotein lipase
 GSK-3: Glycogen Synthase Kinase-3
 GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphat dehydrogenase
 GBM: Glioblastomas
 GI: gastrointestinal
 H. pylori: Helicobacter pylori
 HER2: human epidermal growth factor receptor
 HPETEs: Hydroperoxyeicosatetraenoic acid
 IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
 IL1 β : Interleukin 1 beta
 IL-6: Interleukin 6
 LA: Linoleic acid (W6)
 LCPUFA: long-chain polyunsaturated fatty acids
 LT-B4: Leukotriene B4
 LOX: Lipoxygenase
 LRP-5/6: Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
 MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7
 MUFAs: Multi unsaturated fatty acids
 MTT: Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium
 MMP10: matrix metalloproteinase genes
 NFAT: Nuclear factor of activated T-cells
 NSAIDs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
 NF- κ B: Nuclear Factor κ B
 NO: Nitric oxide
 NPD1: Neuroprotectin D-1
 OA: oleic acid
 PA: palmitoleic acid
 PLA2: Phospholipase A2
 PG: prostaglandin
 PUFA: polyunsaturated fatty acid
 PDT: Population Doubling Time
 PBS: phosphate buffer saline
 PCR: polymerase chain reaction

PKC: proteain kinase c
PMNs: polymorphonuclear leukocytes
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors
PARP: Poly ADP ribose polymerase
ROS: Reactive oxygen species
ROR: Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor
RYK: related to receptor tyrosine kinase
SDS: sodium dodecyl sulfate
STAT3: signal transducers and activators of transcription 3
13-S HODE: 13S hydroxyoctadecadienoic acid
SFRPs: Secreted frizzled-related protein
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TNF: tumor necrosis factor
TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TXs: Thromboxane
VEGFA: vascular endothelial growth factor
WIF: Wnt-inhibitory factor
WT1: wilms tumor

این اثر پژوهشی را تقدیم می کنم به
خانواده و همسر عزیزم
که در این راه مرا یاری کردند...

تقدیر و تشکرات ویژه

بدین وسیله از زحمات استاد راهنما جناب آقای دکتر غیبی و راهنمایی های
جناب آقای دکتر رحمانی و آقای دکتر آزاد و خانم پیشخوان کمال تقدیر و
تشکر را دارم.

چکیده:

سرطان عمده ترین چالش در دنیا و دومین عامل مرگ و میر در دنیا میباشد. بیماری سرطان در ایران از شایعترین بیماریهای مزمن و سومین علت مرگ و میر بعد از بیماری قلبی عروقی و حوادث محسوب میشود. سرطان معده دومین سرطان شایع در آسیا میباشد.

یکی از مسیرهای مهم سیگنالینگ سلولی، مسیر Wnt است که دارای نقش حیاتی و مهمی در تنظیم عملکردهای بدن می باشد. این مطالعه با توجه به اهمیت مسیر سیگنال دهی wnt و ارتباط آن در ایجاد و توسعه سرطان های مختلف انسانی، به بررسی اثرات اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ به عنوان یکی از مواد شایعی که از طریق تغذیه و به طور روزانه وارد بدن میشوند، در غلظت های مختلف میپردازد تا تاثیر آن را بر بیان دو ژن کلیدی این مسیر یعنی WT1 و WIF1 در رده ی سلولی سرطانی معده AGS مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش ها: سل لاین AGS با غلظت های ۲۵۰ الی ۱۵۰۰ میکرومولار اسید چرب لینولئیک اسید (LA)، و با غلظت های ۵۰ الی ۱۰۰۰ میکرومولار اسید چرب آلفا لینولئیک (ALA) تیمار و برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک امگا-۳ و امگا-۶ از تست MTT و فلوسایتومتری استفاده شد. سپس برای بررسی میزان بیان ژن های WT1 و WIF1، RNA سلولی به وسیله کیت استخراج گردید و سنتز cDNA صورت پذیرفت. در پی آن بیان ژن های WIF-1 و WT1 با سیستم PCR - qRT مورد آنالیز قرار گرفت و تفسیر نتایج آن با برنامه ی PFAFFI انجام شد.

نتایج: طبق نتایج به دست آمده از تست MTT، اسید چرب امگا-۳ در غلظت های بالای ۵۰۰ میکرومولار و اسید چرب امگا-۶ در غلظت های بالای ۱۰۰۰ اثرات سایتوتوکسیک را از خود نشان میدهند. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون REAL-TIME هر دو ترکیب اسید چرب امگا-۳ و امگا-۶ با تاثیر بر روی سیگنالینگ Wnt باعث کاهش بیان ژن WT1 و افزایش بیان در ژن WIF میشوند. غلظت های ۵۰۰ میکرومولار امگا-۳ و ۱۰۰۰ میکرومولار امگا-۶ در تست فلوسایتومتری نیز باعث القای آپوپتوز میشوند. نتیجه گیری: ترکیبات اسید چرب امگا-۳ و امگا-۶ با تاثیر در سیگنالینگ Wnt باعث کاهش بیان در ژن WT1 و افزایش بیان در ژن WIF میشوند.

کلید واژه ها: سل لاین AGS، اسید چرب امگا-۶ (LA)، اسید چرب امگا-۳ (ALA)، WIF1، WT1.

فهرست مطالب

فصل اول	۱
مقدمه و اهمیت موضوع	۱
۱-۱ سرطان:	۲
۱-۱-۱ انواع سرطان :	۳
۲-۱-۱: شیوع سرطان:	۳
۳-۱-۱ علل ایجاد سرطان:	۴
۴-۱-۱ روش های درمان سرطان:	۶
۲-۱ سرطان معده:	۷
۱-۲-۱ انواع سرطان معده:	۸
۲-۲-۱ علل ژنتیکی سرطان معده:	۱۰
۳-۲-۱ درمان سرطان معده :	۱۰
۳-۱ اسیدهای چرب :	۱۱
۱-۳-۱: عملکرد اسیدهای چرب ضروری در بدن	۱۳
۴-۱ : مسیر سیگنالینگ wnt	۱۷
۱-۴-۱ canonical Wnt/ β catenin pathway :	۱۹
۲-۴-۱ مسیر غیر اصلی Wnt:	۲۰
۵-۱: اهداف و فرضیات طرح	۲۲
۱-۵-۱: هدف کلی	۲۲
۲-۵-۱ : اهداف فرعی	۲۲
۳-۵-۱ اهداف کاربردی	۲۳

۲۳ ۴-۵-۱ فرضیه ها
۲۴ فصل دوم
۲۴ مروری بر متون
۲۵ ۱-۲ مروری بر مطالعات مربوط به اسیدهای چرب و سرطان:
۳۱ ۲-۲: مروری بر مطالعات پروتئین WIF-1
۳۴ ۳-۲: مروری بر مطالعات پروتئین WT1
۳۸ فصل سوم
۳۸ مواد و روش ها
۳۹ ۱-۳ مواد لازم برای کشت سلول ، استخراج RNA، فلوسایتمتری و REAL TIME:
۴۰ ۲-۳ دستگاه ها و تجهیزات مورد استفاده در آزمایش
۴۱ ۳-۳ خلاصه کار:
۴۲ ۱-۳-۳ محلول ها و بافرهای مربوط به کشت:
۴۳ ۲-۳-۳ کشت سلولی :
۴۳ ۳-۳-۳ پاساژ سلولی (sub culture)
۴۴ ۴-۳-۳ شمارش سلولی :
۴۵ ۵-۳-۳ فریز کردن سلول ها :
۴۶ ۶-۳-۳ دفریز کردن سلول ها :
۴۶ ۴-۳ MTT Assay:
۵۱ ۵-۳ تیمار دارویی سلول ها :
۵۵ ۶-۳ فلوسایتمتری
۶۰ ۷-۳ استخراج RNA :
۶۲ ۱۱-۷-۳ اندازه گیری مقدار RNA تام با استفاده از قرایت جذب نوری:
۶۲ ۲-۷-۳ روش کار با دستگاه اسپکتروفتومتر:
۶۳ ۸-۳ سنتز cDNA :
۶۵ ۹-۳ تعیین دمای اتصال پرایمرها

۶۶	۱-۹-۳ واکنش PCR
۶۷	۲-۹-۳ الکتروفورز ژل آگارز:
۶۹	۱۰-۳ اصول Quantitative Real-Time PCR
۷۶	فصل چهارم
۷۶	نتایج
۷۷	۱-۴ نتایج حاصل از تست MTT برای متغیر امگا-۳
۷۸	۲-۴ نتایج حاصل از تست MTT برای متغیر امگا ۶
	۳-۴ نتایج حاصل از استخراج RNA
	۴-۴ نتایج حاصل از سنتز cDNA
۸۱	۵-۴ نتایج بیان ژن WT1 حاصل شده از REAL-TIME
۸۱	۱-۵-۴ نتایج بیان ژن WT، ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت های مختلف امگا-۳
۸۲	۲-۵-۴ نتایج بیان ژن WT1، ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت های مختلف امگا-۶
۸۴	۶-۴ نتایج بیان ژن WIF حاصل شده از REAL-TIME
۸۴	۱-۶-۴ نتایج بیان ژن WIF، ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت های مختلف امگا-۳
۸۵	۲-۶-۴ نتایج بیان ژن WIF، ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت های مختلف امگا-۶
۸۷	۷-۴ نتایج بدست آمده از فلوسایتومتری
۹۰	فصل پنجم
۹۰	بحث و نتیجه گیری
۹۱	۱-۵ بحث
۹۵	۲-۵ نتیجه گیری
۹۵	۳-۵ پیشنهادات

فهرست تصاویر

- تصویر ۱-۱: گسترش ۱۰ سرطان شایع و شیوع آن در بین زنان و مردان در سال ۲۰۱۶ ۴
- تصویر ۱-۲: نقش عوامل محیطی و ژنتیک در بروز سرطان ۵
- تصویر ۱-۳: نمودار نشان دهنده رابطه میزان بقا و مرحله تشخیص سرطان معده ۷
- تصویر ۱-۴: stage های سرطان معده ۹
- تصویر ۱-۵: مسیرهای متابولیک امگا ۶ و امگا ۳ ۱۲
- تصویر ۱-۶: متابولیت ها تولید شده توسط دو اسید چرب ALA و LA ۱۶
- تصویر ۱-۷: متابولیسم اسید آراشیدونیک و ایکوزاپنتائوئیک اسید ۱۸
- تصویر ۱-۸: مکانیسم فرضی برای سرکوب سرطان معده به علت التهاب مزمن با توجه به DHA ۲۰
- تصویر ۱-۲: تصویر شماتیک از سه مسیر سیگنالینگ Wnt ۲۶
- تصویر ۲-۲: مسیر سیگنالینگ Wnt/ β catenin ۲۷
- تصویر ۲-۳: ساختار ژنی WIF1 ۳۲
- تصویر ۲-۴: A- ساختار ژنی WIF-1 ناحیه رونویسی 71007bp B- ساختار پروموتور WIF-1 انسانی ۳۳
- تصویر ۲-۵: ساختار ژنی WT1 ۳۴
- تصویر ۲-۶: ساختار پروتئین کد شده توسط WT1 ۳۶
- تصویر ۱-۳: لام ثوبار و نحوه شمارش سلول با رنگ آمیزی تریپان بلو ۴۵
- تصویر ۲-۳: مراحل انجام تست MTT ۴۷
- تصویر ۳-۳: مشخصات W3 خریداری شده از شرکت سیگما ۴۹
- تصویر ۳-۴: مشخصات W6 موجود در آزمایشگاه ۴۹
- تصویر ۳-۵: پلیت MTT مربوط به داروی امگا 6 و تایم 24H ۵۱
- تصویر ۳-۶: سلول های تربیت شده با W3 در غلظت های مختلف در تایم ۲۴ ساعت ۵۴

تصویر ۳-۷: سلول های تریت شده با w3 در غلظت های مختلف در تایم ۴۸ ساعت	۵۴
تصویر ۳-۸: سلول های تریت شده با w3 در غلظت های مختلف در تایم ۷۲ ساعت	۵۵
تصویر ۳-۹: سلول های تریت شده با w6 در غلظت های مختلف در تایم ۲۴ ساعت	۵۵
تصویر ۳-۱۰: سلول های تریت شده با w6 در غلظت های مختلف در تایم ۴۸ ساعت	۵۶
تصویر ۳-۱۱: سلول های تریت شده با w6 در غلظت های مختلف در تایم ۷۲ ساعت	۵۶
تصویر ۳-۱۲: تصویر شماتیک از نحوه cell sorting دستگاه فلوسایتومتر	۵۷
تصویر ۳-۱۳: نمودار اطلاعاتی فلوسایتومتری،.....	۵۹
تصویر ۳-۱۴: نمونه دو فاز شده	۶۰
تصویر ۳-۱۵: خلاصه فرایند استخراج RNA	۶۲
تصویر ۳-۱۶: نتایج حاصل از نانو دراپ یکی از نمونه های استخراج شده ی RNA.....	۶۳
تصویر ۳-۱۷: الکتروفورز برای تعیین دمای پرایمرها	۶۹
تصویر ۳-۱۸: آماده سازی نمونه های RT	۷۲
تصویر ۳-۱۹: نتایج Melting Curve برای ژن WIF1.....	۷۳
تصویر ۳-۲۰: نتایج Melting Curve برای ژن WT1.....	۷۴
تصویر ۴-۱: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های AGS پس از تیمار ۲۴ ساعته.....	۸۷
تصویر ۴-۲: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های AGS پس از تیمار ۴۸ ساعته.....	۸۷
تصویر ۴-۳: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های AGS پس از تیمار ۷۲ ساعته.....	۸۸

فهرست جداول

جدول ۳-۱: نسبت مقدار برداشت نمونه برای سنتز Cdna و غلظت RNA	۶۴
جدول ۳-۲: توالی پرایمرهای WT1, WIF1, GAPDH	۶۵-۶۶
جدول ۳-۳: مقادیر استفاده شده و برنامه دمایی quantitative Real time PCR	۷۲

فهرست نمودارها

- نمودار ۴-۱: آنالیز بقای سلول پس از ۲۴ ساعت مواجهه با غلظت های مختلف امگا-۳ ۷۷
- نمودار ۴-۲: آنالیز بقای سلول پس از ۴۸ ساعت مواجهه با غلظت های مختلف امگا-۳ ۷۸
- نمودار ۴-۳: آنالیز بقای سلول پس از ۷۲ ساعت مواجهه با غلظت های مختلف امگا-۳ ۷۸
- نمودار ۴-۴: آنالیز بقای سلول پس از ۲۴ ساعت مواجهه با غلظت های مختلف امگا-۶ ۷۹
- نمودار ۴-۵: آنالیز بقای سلول پس از ۴۸ ساعت مواجهه با غلظت های مختلف امگا-۶ ۷۹
- نمودار ۴-۶: آنالیز بقای سلول پس از ۷۲ ساعت مواجهه با غلظت های مختلف امگا-۶ ۸۰
- نمودارهای ۴-۷: آنالیز بیان ژن WT1 در حضور امگا ۳ به ترتیب در تایم های (A) ۲۴، (B) ۴۸، (C) ۷۲ ساعت ۸۱
- نمودار ۴-۸: آنالیز بیان ژن WT1 در حضور امگا ۶ به ترتیب در تایم های (A) ۲۴، (B) ۴۸، (C) ۷۲ ساعت ۸۳
- نمودار ۴-۹: آنالیز بیان ژن WIF در حضور امگا ۳ به ترتیب در تایم های (A) ۲۴، (B) ۴۸، (C) ۷۲ ساعت ۸۵
- نمودار ۴-۱۰: آنالیز بیان ژن WIF در حضور امگا ۶ به ترتیب در تایم های (A) ۲۴، (B) ۴۸، (C) ۷۲ ساعت ۸۶
- نمودار ۴-۱۱: آنالیز اطلاعات گرفته شده از فلوسایتومتری سلول های AGS تیمار شده با امگا ۳ ۸۹
- نمودار ۴-۱۲: آنالیز اطلاعات گرفته شده از فلوسایتومتری سلول های AGS تیمار شده با امگا ۶ ۹۸